

## 胆管閉塞ラットにおける血漿から赤血球へのリン脂質移行の機構

石 川 秀 人

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉 教授)

谷 口 正 子

札幌医科大学化学第2講座 (主任 坂上利夫 教授)

### Mechanism of Phospholipid Transfer from Plasma to Erythrocytes in Bile Duct Ligated Rats

Hideto ISHIKAWA

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. H. Hayasaka)

Masako TANIGUCHI

Department of Biochemistry (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Sakagami)

An experimental study was carried out *in vitro* and *in vivo* in order to clarify the mechanism by which abnormal erythrocytes occur in bile duct ligated rats.

(1) Radioactive phospholipid precursors ( $^{32}\text{P}$ -inorganic phosphate and  $^{14}\text{C}$ -glycerol) were intraperitoneally injected into rats with simultaneous treatment of either a bile duct ligation or a sham operation. Incorporation of the precursors into phospholipids in liver, plasma and erythrocytes were observed at the 5th hour, 1st and 2nd day after the treatments. Both the amounts and radioactivities in saturated-dienoic phosphatidylcholine in liver, plasma as well as in erythrocytes increased in the bile duct ligated rats as compared to those of the sham operated rats. This suggested that bile phosphatidylcholine, which contains much dienoic fatty acid, strongly participated in the metabolism of phospholipids in bile duct ligated rats.

(2) Patterns of the transfer of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine from plasma to erythrocytes were found to be different between those of the bile duct ligated and sham operated rats. In sham operated rats lysophosphatidylcholine predominated in the transfer of phospholipid. On the other hand, in bile duct ligated rats the degree of direct transfer of phosphatidylcholine increased.

(3) To further elucidate the different mechanism between bile duct ligated and sham operated rat phospholipid transfer, *in vitro* experiments were performed. It is conceivable that increased bile acids found in the bile duct ligated rat plasma, or exogenously added bile acid, brought about the changes in the phospholipid organization in erythrocyte membranes and this resulted in the direct transfer of phosphatidylcholine.

(Received March 11, 1985 and accepted March 25, 1985)

**Key words:** Phospholipid transfer, Rat plasma, Rat erythrocytes, Bile duct ligation

#### 1 緒 言

ヒトをはじめ、種々の動物の赤血球膜を構成する脂

質は赤血球で生成され代謝回転するのではなく、もっぱら血漿脂質から供給されて代謝されている<sup>1-7)</sup>。一方ヒトの閉塞性黄疸や各種の肝疾患患者の赤血球ではそ

の脂質構成や形態に変化がみられ、異常赤血球が出現する<sup>8-11)</sup>。これらの脂質構成の変化や赤血球形態変化の生成機序は血漿脂質との相互作用の変化によると考えられているが必ずしも明らかでない。

著者らは、胆管閉塞ラットを用い、赤血球と血漿脂質の *in vivo*, *in vitro* での代謝機構を正常のそれらと比較する事によって異常赤血球生成の機序を明らかにしたいと考えた。

従来の研究では、ヒト患者血液を用いてこれらの研究が行われてきたが<sup>8-11)</sup>、ヒトの場合、慢性時はもとより急性時でも胆管閉塞のごく初期の段階からの変化を把握する事は技術的にも実験的にも困難である。従って著者らはラットを用いて胆管閉塞直後から経時的に詳細な分析を行ってきた<sup>12,13)</sup>。すなわち胆管閉塞群の赤血球、血漿の脂質組成の変化と赤血球形態との関係などについて検討し、次に示す様な事柄を明らかにして来た。(1)胆管閉塞直後より血漿中には胆汁酸、ビリルビンが急速に上昇し、それに伴い spur cell (有棘赤血球) が出現する。(2)血漿コレステロール、リン脂質は(1)の変化に比してやや遅れて上昇し、2日目以降より低下するが、赤血球の phosphatidylcholine (PC)、コレステロールの上昇は更に遅れて1週間目をピークとして定常状態に達する。赤血球、コレステロール、PCの上昇に伴い形態は spur cell から target cell へと変化する。(3)胆管閉塞後の赤血球と血漿の脂肪酸組成の変化を検討し、胆管閉塞により血中へ逆流した胆汁由来のPCが積極的に赤血球へ取り込まれる事を示唆する結果を得てきた。

本実験では胆管閉塞と同時に放射性無機リン酸(<sup>32</sup>Pi)を腹腔内に投与し、その後の肝、血漿、赤血球のリン脂質及びPC分子種への取り込みについて、胆管の閉塞は行わずその他の処置は全く同様に行った対照群と比較検討する事により、胆管閉塞時に赤血球に増加するPCの由来とその機構を解明しようとした。また未だ不明な点の多い正常赤血球、血漿間のリン脂質交換反応機構の解明をも試みた。その結果、胆管閉塞赤血球に増加するPCは主に胆汁由来の di 不飽和 PC である事、更に対照群における血漿から赤血球へのPCの移行は、lysophosphatidylcholine (lyso PC)を経由する割合が多いが、胆管閉塞群ではPCのまま直接移行する割合が多くなっている事が明らかにされた。

## 2 実験材料および実験方法

### 2.1 実験材料

ウィスター系ラット 40 匹以上(雄、体重 250 g 前後)

を用い、軽度のエチルエーテル麻酔後ベントバルビタールナトリウム(30 mg/kg)を腹腔内投与し麻酔後開腹、総胆管を結紮離断した胆管閉塞群と総胆管は結紮離断せずにその他の処置は全く同様に行った対照群(単開腹群)に分け、開腹と同時に放射性無機リン酸(<sup>32</sup>Pi)を腹腔内に投与、術後各々5時間、1日、2日後に再開腹し、総胆管の結紮離断を確認した上、下大静脈よりヘパリン採血を行った。また各々の肝臓も生理食塩水約 70 ml にて灌流脱血後採取した。

血液は直ちに氷冷し、3,000 rpm、20 分間の遠心により血球成分と血漿に分離、更に血球成分を10倍量の氷冷生理食塩水で3回洗浄、遠心し赤血球(packed cell)を得た。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 脂質の抽出

赤血球(packed cell)に等量の蒸留水を加えて混和後11倍量のイソプロパノールを加えよく攪拌後1時間暗所室温で放置、これに7倍量のクロロホルムを加えよく攪拌後1夜暗所室温放置した<sup>14)</sup>。これを濾過し濾液を減圧乾固した後クロロホルム：メタノール液(2:1, v/v) 50 ml に溶かし、0.04%塩化カルシウム溶液0.2倍容量で洗浄、下層を更にFolch洗浄液(クロロホルム：メタノール：水=3:48:47, v/v/v)0.15倍容量で3回洗浄後減圧乾固し、10 ml のクロロホルム溶液で一定量とした<sup>15)</sup>。

血漿に20倍容量のクロロホルム：メタノール液(2:1, v/v)を加え、よく攪拌後1夜暗所室温で放置、これを濾過し0.04%塩化カルシウム溶液0.2倍容量で洗浄、下層を更にFolch法で3回洗浄し10 ml のクロロホルム溶液で一定量とした。

肝臓も血漿と全く同様の方法にて処理を行い、20 ml のクロロホルム溶液で一定量とした。

#### 2.2.2 リン脂質および脂肪酸組成の分析

脂質抽出液の総リン脂質の定量は分光光度計(日立 model 100-22)を用いてBartlettの方法<sup>16)</sup>にて測定した。また各リン脂質の分離分析は、以下に示す薄層クロマトグラフィ(thin layer chromatography=TLC)で行った。

##### 2.2.2.1 リン脂質組成分析法

0.001 M 炭酸ナトリウム溶液で作製した薄層クロマトプレート(silica gel H, Merck 社、厚さ 0.5 mm)を使用直前 110°C 2 時間活性化し展開溶媒はクロロホルム：メタノール：酢酸：水(25:15:3.5:1, v/v/v/v)を用い、発色には I<sub>2</sub> を用いた。各リン脂質は原点より上に向かって順次 lysophosphatidylcholine(以下 lyso

PC), sphingomyelin (以下 SPH), PC, phosphatidylserine + phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine (以下 PE) に分離された。これを冷暗所一夜放置し  $I_2$  の発色が消退した後、各スポットをかき出し、Bartlett 法<sup>16)</sup>にて各リン脂質量を定量した。

#### 2.2.2.2 PC および PC の各分子種の分離精製

PC の分離精製は silica gel G (Merck 社) クロマトプレートを用い、100  $\mu$ g 脂質リン量をプレートの下端より 2 cm の所に帯状にスポットし、展開溶媒クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4, v/v/v) で展開後、0.5% の 2-7 ジクロルフルオレスセインエタノール溶液で発色後蛍光下で識別し、PC 画分をかき出した。

かき出した PC 画分をクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (50:39:1:10, v/v/v/v) 溶液で 4 ml ずつ 4 回にわたって抽出後、抽出液を 1/4 倍容量の 4 M アンモニア溶液で中和洗浄し、下層の溶液を更に 1/4 倍容量の 50% メタノール溶液で 2 回洗浄した後窒素気流下で乾固を行いクロロホルム溶液で一定量とした。

PC の分子種の分離は Arvidson 法<sup>17)</sup>を改良した方法で行った。即ち 15% 硝酸銀を含む silica gel H プレート (厚さ 0.5 mm) を作製し、200°C 4 時間乾燥後 30~40  $\mu$ g lipid-P を含む PC 抽出液をプレート下端より 2 cm の所にスポットし、展開溶媒クロロホルム:メタノール:水 (60:30:5, v/v/v) を用い 3 時間展開した。展開後、0.2% 2-7 ジクロルフルオレスセインで発色し各分子種を上記 PC 抽出のときと同様の方法で抽出し、4 M アンモニア溶液で洗浄、下層をメタノール:0.5% NaCl (1:1, v/v) 溶液で洗浄、窒素乾固後クロロホルム溶液で一定量とした。

#### 2.2.2.3 BF<sub>3</sub> 法による脂肪酸メチルエステルの調製と分析

血漿 PC, 赤血球 PC 及び Lp-X 中の PC の silica gel H プレートにて分離した抽出液を窒素気流下に乾固し、Metcalf *et al.*<sup>18)</sup>の方法で BF<sub>3</sub>-メタノール法にてメチル化し、脂肪酸メチルエステルを得た。これらの脂肪酸メチルエステルを、日立ガスクロマトグラフ K53 を用いて分析した。カラム充填剤ユニソール 3,000 (メッシュ 80~100) を用い、230°C, キャリアーガス窒素、流速 60 ml/min の条件で分析を行った。脂肪酸の定量は半値幅法によって行った。

#### 2.2.3 In vitro における血漿から赤血球への PC, lyso PC への移行

胆管閉塞と同時に <sup>32</sup>Pi を腹腔内投与 1 日後のラットから <sup>32</sup>Pi で標識された胆管閉塞血漿 (<sup>32</sup>Pi ligated plasma) を得た。また同様に対照群のラットに <sup>32</sup>Pi を

投与したものから、<sup>32</sup>Pi で標識された対照群血漿 (<sup>32</sup>Pi control plasma) を得た。一方、胆管閉塞後 1 日目のラットより胆管閉塞赤血球 (ligated RBC) を、対照群のラットより対照群赤血球 (control RBC) を得た。

<sup>32</sup>Pi ligated plasma, <sup>32</sup>Pi control plasma を donor として、ligated RBC および control RBC を acceptor として各 1 ml を用い、<sup>32</sup>Pi ligated plasma + ligated RBC, <sup>32</sup>Pi ligated plasma + control RBC, <sup>32</sup>Pi control plasma + ligated RBC, <sup>32</sup>Pi control plasma + control RBC, の組み合わせで、0, 3, 6 時間インキュベート後の赤血球の PC, lyso PC の放射能の値より、<sup>32</sup>Pi plasma からのこれらリン脂質の移行量を測定した。

#### 2.2.4 In vitro における <sup>32</sup>Pi lyso PC の赤血球への移行

In vivo で標識された lyso PC の ligated RBC と control RBC への取り込みの差および赤血球内での PC への変換速度に差があるか否かを in vitro の系を用いて検討した。In vivo により <sup>32</sup>Pi で標識された血漿 PC (<sup>32</sup>Pi plasma PC) を抽出し phospholipase A<sub>2</sub> で加水分解、<sup>32</sup>Pi で標識された lyso PC (<sup>32</sup>Pi plasma lyso PC) を得た。極く少量の生理食塩水中で超音波処理した後、正常ラットの血漿に suspend する。Control RBC 3 ml と ligated RBC 3 ml それぞれと、<sup>32</sup>Pi plasma lyso PC をインキュベートし、3 時間後に各赤血球、血漿を分離し脂質画分を抽出分離後、lyso PC, PC 画分の放射能の値を測定した。

#### 2.2.5 放射能測定方法

一定容量の脂質抽出液をバイアルビンにとり温風乾燥後、5 ml のトルエンシンチレーター (0.4% の 2,5-diphenyloxazole, 0.01% の 1,4-bis[2-(5-phenyl-oxazolyl)]benzene) に溶解、よく攪拌後、Beckman LS-250 液体シンチレーションスペクトロメーターを用い測定した。測定値は blank 値を差し引き、<sup>32</sup>Pi の半減期を 14 日、減衰開始日を 100% とし減衰曲線に従って補正した。

#### 2.2.6 異常リポ蛋白質 Lp-X の分離法

Lp-X の分離は Ritland の方法<sup>19)</sup>を改良して行った。寒天ゲルの調製は、1.5% Bacto agar (Difco 社) をパルビタール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.05) に溶かして 2 mm の厚さにガラス板上に塗布した。450 Volt, 3.5 mA/cm, 2 時間以上電気泳動する事により Lp-X は⊖極、他のリポ蛋白は⊕極の方へ移動する。発色は 0.25% ヘパリン液 (0.1 M 塩化マグネシウム, 1.3% 塩化ナトリウムを含む) を用いたが、寒天より脂質を抽

出する場合は発色を行わず、また寒天プレートのための blank の抽出も行った。

### 3 成 績

#### 3.1 胆管閉塞ラットの血漿、胆汁および Lp-X 中の PC 脂肪酸組成

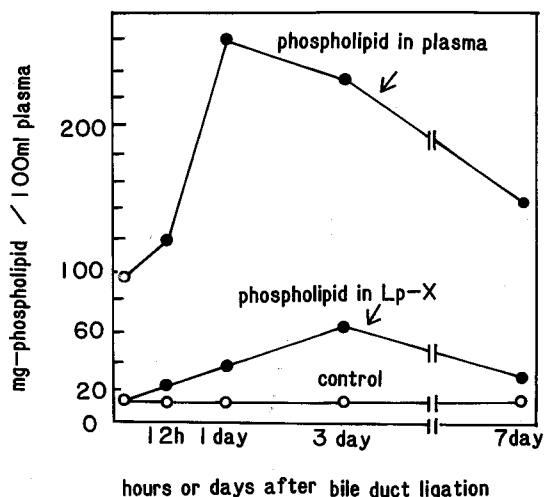
著者らはこれまでの報告で胆管閉塞後増加する赤血球の PC は、その脂肪酸の分析結果から胆管閉塞後上昇する血漿中の PC に由来する事を明らかにして来た<sup>12,13)</sup>。一方、ヒト胆管閉塞血漿には胆汁由来の異常リポ蛋白質 (Lp-X) が存在し、Lp-X が赤血球膜と直接融合する事によって赤血球 PC 含量が増加すると報告されている<sup>9,10,20)</sup>。著者らは、Lp-X と赤血球 PC との関係を明らかにする目的で、先ず Lp-X の分離を行った。Lp-X に含まれるリン脂質含量の変化と総血漿リン脂質の変化との関係を Fig. 1 に示した。閉塞後血漿中に増加するリン脂質は大部分 PC であり、Lp-X 中のリン脂質も PC が大部分を占めた。血漿リン脂質は胆管閉塞後急速に増加するが Lp-X の増加は緩慢である。胆管閉塞後 3 日目の Lp-X 中の脂肪酸組成を Table 1 に示した。Lp-X は電気泳動を行うと他のリポ蛋白と異なり陰極へ移動するという性質を利用して分離した。Lp-X の PC の脂肪酸組成は、胆管閉塞時の総血漿 PC の脂肪酸組成と同様であり、他のリポ蛋白中の PC 脂肪酸組成とも異なっていない。

先に著者らが報告した結果<sup>12)</sup> および Table 2 から示される様に血漿、赤血球の PC 脂肪酸組成の変化は閉塞後 1~2 日目に最も著しい。胆管閉塞後 3 日目以降のラットにおいて閉塞箇所胆汁のうっ滞が認められたのでこれを注射筒で採取し脂質画分を抽出した。閉塞後胆汁中の PC 脂肪酸組成の経時変化はなく C<sub>16:0</sub> C<sub>18:0</sub> の多いことが示された。血漿 PC と赤血球 PC の脂肪酸組成は胆汁中の PC により影響されていることが明らかになった。

**Table 1** Fatty acid composition in phosphatidylcholine in plasma and in Lp-x at 3rd day after bile duct ligation (Percent total fatty acids).

Fatty acids	Phosphatidylcholine in control rat plasma	Phosphatidylcholine in bile duct ligated rat		
		Plasma	(+)* <sup>-1</sup>	(-)* <sup>-2</sup>
C <sub>16:0</sub>	27.7	35.8	34.3	34.2
C <sub>18:0</sub>	25.1	16.5	18.6	18.4
C <sub>18:1</sub>	8.8	10.3	10.7	10.2
C <sub>18:2</sub>	28.1	25.4	26.0	26.6
C <sub>18:4</sub>	10.3	12.0	10.3	10.0

\*<sup>-1</sup>; phosphatidylcholine in Lp-X, \*<sup>-2</sup>; phosphatidylcholine in lipoproteins other than Lp-x  
Each value is the mean of comparable triplicate experiments.



**Fig. 1** Changes of the phospholipid concentration in plasma and in Lp-X after bile duct ligation. In sham operated rat plasma, a small portion of lipoprotein moves into anode in electrophoresis (○—○, control). The method for the separation of Lp-X is shown in Materials and Methods. Values are expressed as means of closely comparable triplicate experiments.

これらの結果から、胆管閉塞後初期段階における血漿 PC および赤血球 PC は単に胆汁よりの Lp-X のみに由来しているとは結論づけられない事が示された。

#### 3.2 胆管閉塞による放射性リン脂質前駆体の肝、血漿および赤血球リン脂質への取り込みにおよぼす影響

*In vivo* で胆管閉塞と同時に放射性リン脂質前駆体を投与し、肝、血漿、赤血球 PC 脂肪酸種への取り込みを胆管閉塞群と対照群で比較検討した。更に胆管閉塞によるリン脂質代謝への影響と血漿、赤血球間のリン脂質交換反応へ及ぼす影響についても検討した。

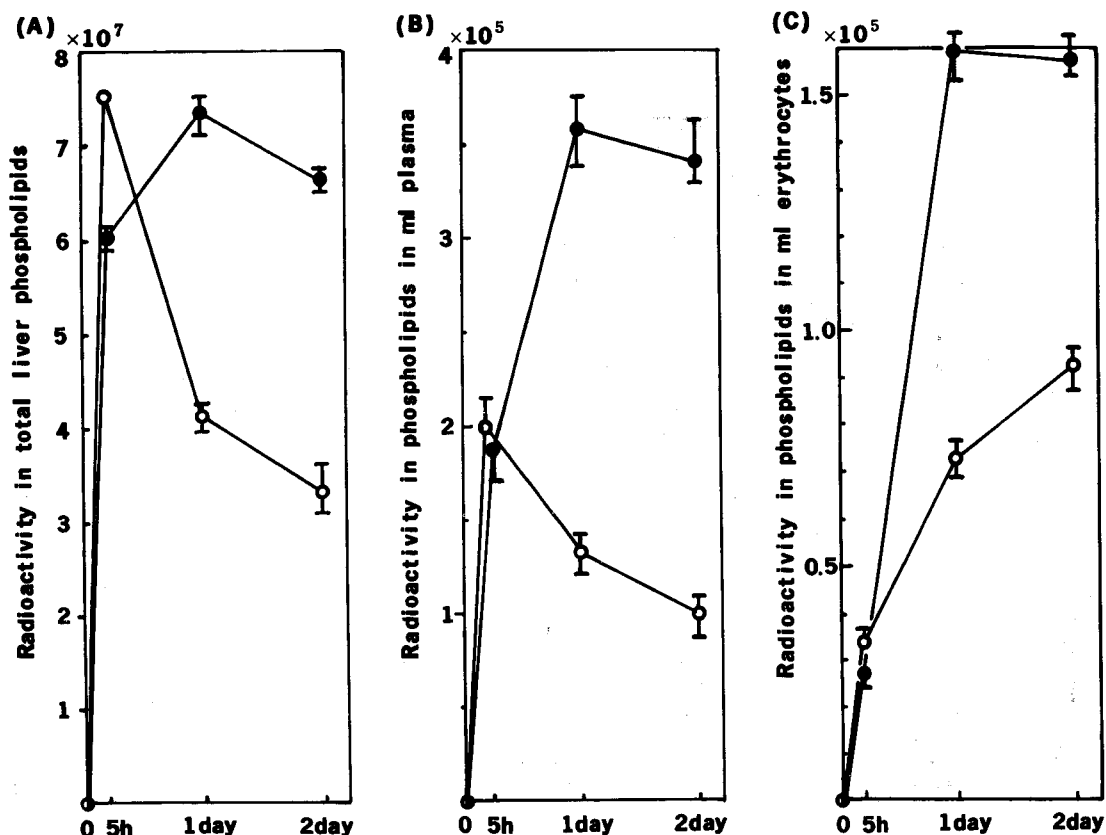
Fig. 2 は、胆管閉塞と同時に放射性無機リン酸(<sup>32</sup>Pi)を投与し、5 時間、1 日、2 日目のラットと、対照群

**Table 2** Changes of the fatty acid composition of phosphatidylcholine in bile, plasma and erythrocytes after bile duct ligation (Percent of total fatty acids).

Tissues	Bile			Plasma* <sup>-1</sup>					Erythrocytes* <sup>-1</sup>				
Hours or days after bile duct ligation	3	7	14	0	5h	1	2	5	0	5h	1	2	5
Fatty acids													
C <sub>16:0</sub>	42.2	41.3	44.1	27.2	32.0	33.2	34.4	30.4	48.9	49.3	54.3	55.5	53.9
C <sub>16:1</sub>	3.7	3.4	3.1	0.7	1.6	2.2	1.9	1.7	tr	tr	tr	tr	tr
C <sub>18:0</sub>	12.3	11.6	11.7	21.2	18.8	15.7	15.2	16.8	19.6	18.5	11.6	9.5	15.9
C <sub>18:1</sub>	11.3	11.3	11.4	8.8	8.8	10.9	11.7	12.4	9.3	10.8	10.0	9.7	11.2
C <sub>18:2</sub>	22.9	23.2	23.4	28.1	25.4	25.4	23.8	25.9	12.3	13.9	17.5	17.5	13.2
C <sub>20:4</sub>	8.8	10.4	7.9	14.1	13.3	12.6	12.9	12.7	9.9	7.4	6.6	7.8	5.8

\*<sup>-1</sup>; These data are previously reported by our laboratory (13).

Each value is the mean of comparable three or more experiments.

**Fig. 2** Incorporation of radioactivities into total phospholipids in liver, plasma and erythrocytes after the injection of <sup>32</sup>Pi. Rats were treated with bile duct ligation or sham operation just before the injection of <sup>32</sup>Pi.

(A); liver, (B); plasma and (C); erythrocytes.

Values are expressed as cpm per total phospholipids (○—○; in sham operated, ●—●; in bile duct ligated rats) in liver, plasma (ml) and erythrocytes (ml). Standard errors are shown by the vertical bars.

ラットの肝 (A), 血漿 (B), 赤血球 (C) の総リン脂質への  $^{32}\text{P}$ i の取り込みをみたものである。

5 時間では肝で特に对照群で高い値を示すほか、血漿、赤血球では閉塞群とほぼ等しい取り込みを示した。1 日目、2 日目では、肝、血漿、赤血球全て閉塞群が高い値を示している。胆汁 PC は肝でつくられ、肝 PC の代謝回転の早い pool に由来すると報告されている<sup>21)</sup>。1 日目の肝での高い放射能の値は、胆管閉塞により肝にうっ滞した代謝回転の早い PC (高い比放射能をもつ PC) の影響と考えられる。また血漿では同様に肝にうっ滞した胆汁が血中に流入したため血漿中のリン脂質の絶対量も増大すると共に放射能の値も高くなっている。赤血球リン脂質への取り込みは、胆管閉塞群で高い値を示している。

胆汁の主なリン脂質は PC である。Fig. 3 は Fig. 2 と同じ条件での  $^{32}\text{P}$ i の PC への取り込みを検討したものである。胆管閉塞後血漿中に増加するリン脂質は、その大部分が PC であり、それ故 1 日目の血漿 PC は胆管閉塞群と对照群で Fig. 2 に比べて大きな差として示される。また赤血球では PC 以外に lysoPC への  $^{32}\text{P}$ i の取り込みが对照群で大きいため、閉塞群で Fig. 2 に比して大きな差として示された。同様の実験を  $^{14}\text{C}$ -glycerol を用いた場合 (Fig. 4),  $^{32}\text{P}$ i と同じ傾向を示した。

Fig. 5 は PC の specific activity (SA, cpm/ $\mu\text{g}$  lipid-p) 変化を示した。肝、血漿で閉塞群と对照群でそれ程大きな差異を示さないが、赤血球で大きい事は、閉塞群の赤血球 PC は对照群のそれに比しより多く移行されている事を示している。

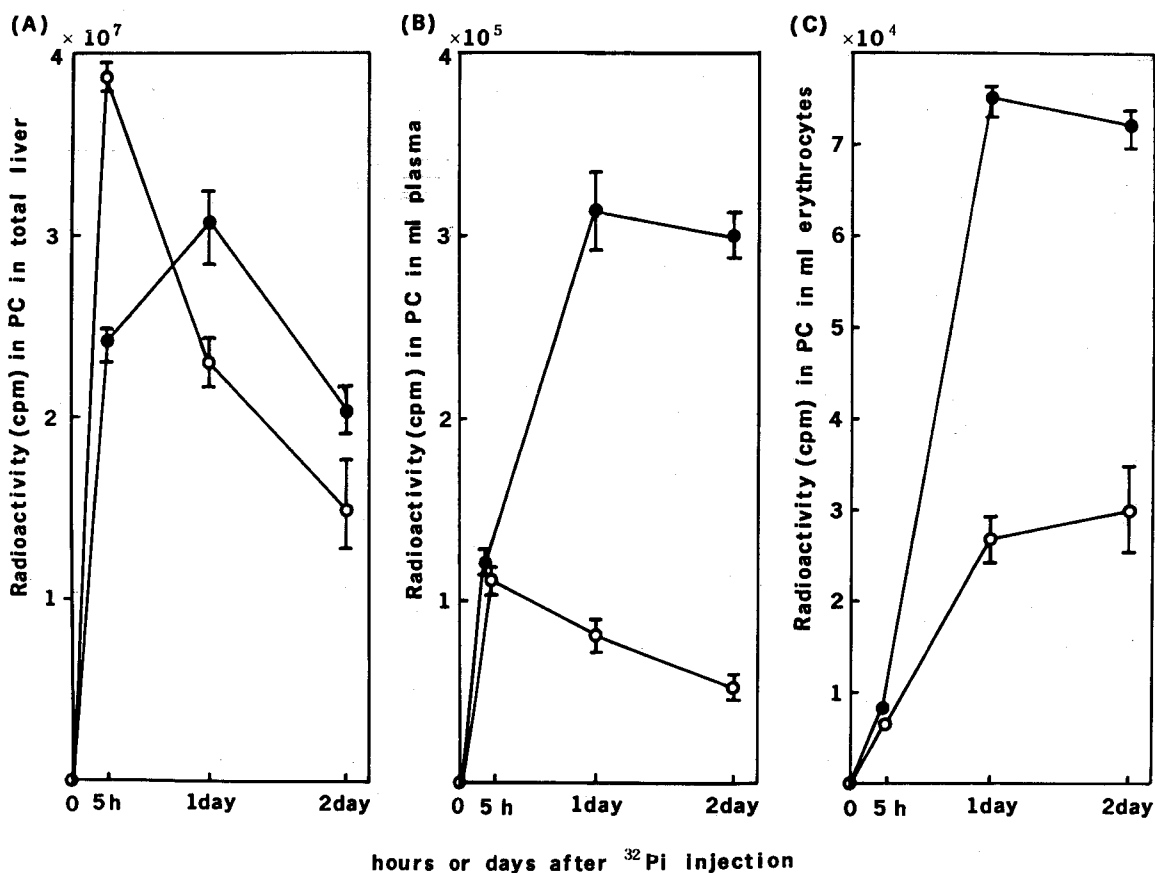


Fig. 3 Incorporation of radioactivities into phosphatidylcholine in liver, plasma and erythrocytes after the injection of  $^{32}\text{P}$ i. Rats were treated with bile duct ligation or sham operation just before the injection of  $^{32}\text{P}$ i.

(A); liver, (B); plasma and (C); erythrocytes.

Values are expressed as cpm per phosphatidylcholine ( $\circ$ — $\circ$ ; in sham operated,  $\bullet$ — $\bullet$ ; in bile duct ligated rats) in liver, plasma (ml) and erythrocytes (ml). Standard errors are shown by vertical bars.

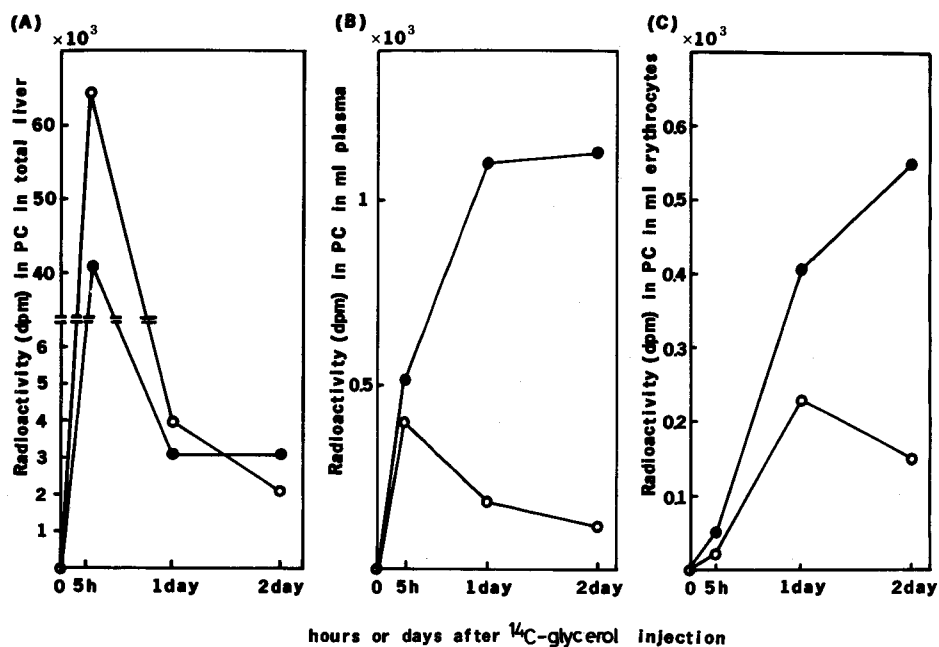


Fig. 4 Incorporation of radioactivities into phosphatidylcholine in liver, plasma and erythrocytes after the injection of  $^{14}\text{C}$ -glycerol. Rats were treated with bile duct ligation or sham operation just before the injection of  $^{14}\text{C}$ -glycerol.

(A); liver, (B); plasma and (C); erythrocytes.

Values are expressed as cpm per phosphatidylcholine ( $\circ$ — $\circ$ ; in sham operated,  $\bullet$ — $\bullet$ ; in bile duct ligated rats) in liver, plasma (ml) and erythrocytes (ml). Standard errors are shown by vertical bars.

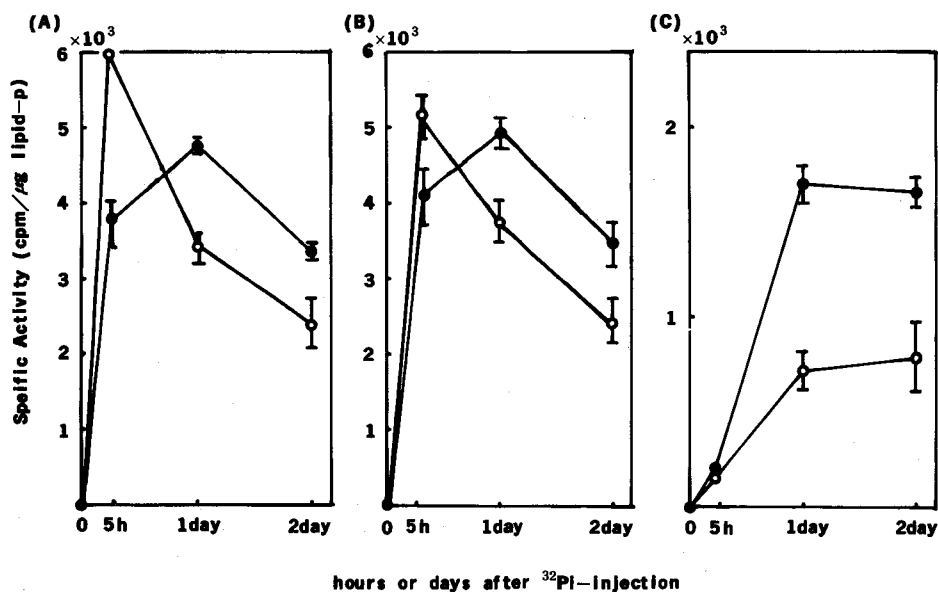


Fig. 5 Changes in the specific activities of phosphatidylcholine after the injection of  $^{32}\text{Pi}$ . Rats were treated with bile duct ligation or sham operation just before the injection of  $^{32}\text{Pi}$ .

Values are expressed as specific activities (cpm per  $\mu\text{g}$  lipid-P) in liver (A), plasma (B) and erythrocytes (C) in sham operated ( $\circ$ — $\circ$ ) or bile duct ligated ( $\bullet$ — $\bullet$ ) rats. Standard errors are shown by vertical bars.

Table 3 は,  $^{32}\text{Pi}$  の各リン脂質への取り込みが胆管閉塞によりどの様に影響されているかについて肝で検討したものである。各リン脂質とも PC ほど著しくはないがほぼ同様に 1 日, 2 日目で閉塞群で高い値を示している。胆管閉塞後 4 日目のラットに  $^{32}\text{Pi}$  を投与し, その後 1 日目の取り込みの値を示した (\* $^{-1}$ )。閉塞と同時に  $^{32}\text{Pi}$  を投与したものに比べて低い値を示している。これは閉塞後 4 日経過したことにより肝での胆汁生成がおさえられたこと, また胆汁以外の肝リン脂質合成に対する抑制的な影響があらわれたためとも考えられる。

Table 4 に Table 3 と同じ実験条件での血漿の値を示した。Table 3 と同様の結果を示す。Table 5 は Table 3, 4 と同じ実験条件での赤血球への取り込みの結果を示す。肝, 血漿に比して極端にその影響が示されている。赤血球は血漿よりそのリン脂質が供給されている。それ故赤血球の放射能の取り込みは血漿リン脂質に大

きく影響され, 血漿 PC の比放射能に閉塞群と対照群で大きな差のない時には放射能の値が血漿から赤血球への移行の速度を反映すると考えてよい。5 時間の赤血球で PC の取り込みは血漿 PC の比放射能の値を反映しているが, lyso PC は対照群で著しく大きな値を示している。これは後に示す胆汁酸による血漿から赤血球への lyso PC の移行の抑制の結果と一致する。1 日, 2 日目では閉塞群で対照群に比し血漿 PC が約 2 倍の速さで赤血球へ移行していることが示された。Lyso PC は対照群で取り込みが多くなっている。すなわち対照群では従来言われている様に血漿 PC の大部分は lyso PC 経由で赤血球へ移行するが, 閉塞群では PC そのままの移行が多いことが示された。

### 3.3 胆管閉塞による放射性リン脂質前駆体の PC 脂肪酸種への取り込みに及ぼす影響

Fig. 5 で肝(A), 血漿(B), 赤血球(C)の PC の SA

**Table 3** *Changes of the specific activity in each phospholipid in liver after bile duct ligation or sham operation with simultaneous injection of  $^{32}\text{Pi}$ .*

Hours or days after the treatment	5 hour		1 day			2 day	
	Bile duct ligated	Sham operated	Bile duct ligated	Bile duct ligated* $^{-1}$	Sham operated	Bile duct ligated	Sham operated
Phosphatidylethanolamine	6854	7224	5199	5000	4495	6622	3156
Phosphatidylserine + inositol	2211	1846	5285	4133	5784	7665	6798
Phosphatidylcholine	3694	6004	4754	3652	3546	4228	2311
Sphingomyelin	1299	2428	2437	1880	1898	3037	2010
Lysophosphatidylcholine	996	1414	1650	1501	1431	1008	1105

\* $^{-1}$ ; At 4th day after bile duct ligation,  $^{32}\text{Pi}$  was injected into the rat, and at 5th day the rat was sacrificed.

Each value is the mean of comparable three or more experiments.

**Table 4** *Changes of the specific activity in each phospholipid in plasma after bile duct ligation or sham operation with simultaneous injection of  $^{32}\text{Pi}$ .*

Hours or days after the treatment	5 hour		1 day			2 day	
	Bile duct ligated	Sham operated	Bile duct ligated	Bile duct ligated* $^{-1}$	Sham operated	Bile duct ligated	Sham operated
Phosphatidylethanolamine	526	905	1144	1458	834	1558	1455
Phosphatidylserine + inositol	1097	1389	1747	1806	1988	1842	2050
Phosphatidylcholine	4156	5250	4983	4355	3750	3791	2435
Sphingomyelin	1746	1750	3385	1836	2221	2241	2460
Lysophosphatidylcholine	3254	4259	3908	3710	3556	3801	3659

\* $^{-1}$ ; At 4th day after the bile duct ligation,  $^{32}\text{Pi}$  was injected into the rat, and at 5th day the rat was sacrificed.

Each value is the mean of comparable three or more experiments.



**Table 5** *Changes of the specific activity in each phospholipid in erythrocytes after bile duct ligation or sham operation with simultaneous injection of  $^{32}\text{P}$ i.*

Hours or days after the treatments	5 hour		1 day			2 day	
	Bile duct ligation	Sham operation	Bile duct ligation	Bile duct ligation* <sup>-1</sup>	Sham operation	Bile duct ligation	Sham operation
Phosphatidylethanolamine	63	89	153	130	102	273	159
Phosphatidylserine + inositol	65	70	277	300	213	302	344
Phosphatidylcholine	169	242	1657	1106	773	1533	803
Sphingomyelin	42	119	319	400	200	522	457
Lysophatidylcholine	338	1177	1879	1700	1795	1698	1883

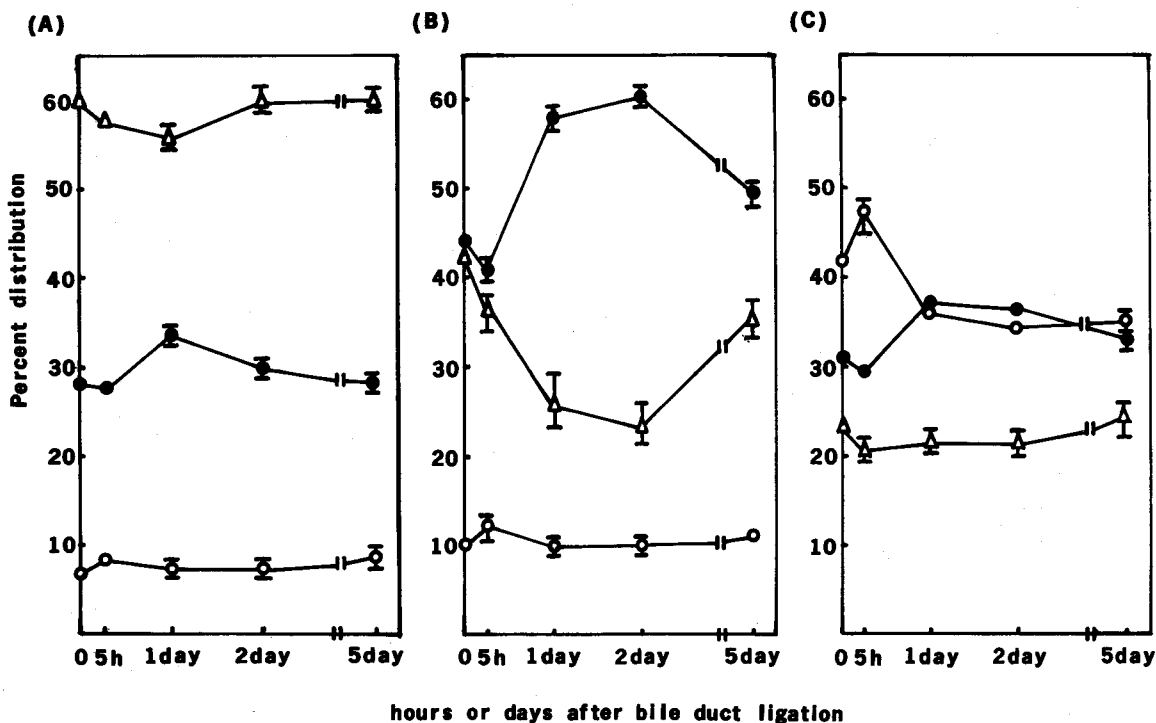
\*<sup>-1</sup>; At 4th day after the bile duct ligation  $^{32}\text{P}$ i was injected into the rat, and at 5th day the rat was sacrificed.

Each value is the mean of comparable three or more experiments.

の変化を図示したが、次にそれではどんな脂肪酸種 PC が血漿より赤血球へ移行しやすいのか、また胆管閉塞により移行する PC の脂肪酸種は変化するかどうか、更にその放射能の取り込みの様子から胆管閉塞により増加する赤血球 PC が何に由来するのかについて示唆を

得るために肝、血漿、赤血球 PC をその脂肪酸分子種に分離し量的変化、また放射能の取り込みについて検討した。

Fig. 6 は各臓器の総 PC 中の各 PC 分子種の割合の変化を示した。肝では 1 日目に di-不飽和 PC の増加が示



**Fig. 6** Changes in the percent distribution of each molecular species of phosphatidylcholine after bile duct ligation or sham operation.

(A); liver, (B); plasma and (C); erythrocytes.

Saturated-saturated and saturated-monoenoic (○—○), saturated-dienoic (●—●) and polyenoic (saturated-tetraenoic, dienoic-dienoic and saturated-hexaenoic) fractions (□—□) are shown. Standard errors are shown by vertical bars.

された。血漿は1日以降、di-不飽和PCの増加とtetra-, hexa-不飽和画分の減少が認められた。血漿PC量は著しく上昇していることから、tetra-, hexa-不飽和画分の絶対量の減少はないものと考えられる。赤血球では1日以降においてdi-不飽和PCの増加と、飽和PC+mono-不飽和PCの減少が著しい。赤血球PCの増加は1日、2日目では約10%と示されており<sup>12,13)</sup>、増加したPCは主にdi-不飽和PCと考えられる。

Table 6は、薄層クロマトプレート上で各分子種に分離された画分に含まれる脂肪酸組成を対照群の血漿PCについて検討したものである。ほぼ完全に各画分は分離されていることが示された。di-di-不飽和画分が、TLC上のdi-不飽和とtetra-不飽和の中間に存在し、C<sub>18:2</sub>を2個含むことが確かめられた。この画分は胆管閉塞群ではその占める割合は少なくなる（データには示していない）。この事はTable 1で血漿PCの脂肪酸組成においてC<sub>18:2</sub>が胆管閉塞と共に減少するにもかかわらず、di-不飽和画分の上昇するという事実を説明しているものと考えられる。

Fig. 7は、肝PCの脂肪酸種への<sup>32</sup>Piの取り込み変化を胆管閉塞群と対照群で比較したものである。Mono-, tetra-, hexa-不飽和画分ではそれ程大きな差異はないが、di-不飽和画分において両者間により大きな差異が認められた。Fig. 6, Fig. 7より胆管閉塞によりdi-不飽和PCへの高い放射能の取り込みと量的増加が示された。

Fig. 8は同様に血漿PCの各脂肪酸分子種における放射能の取り込みを示した。1日、2日目、飽和+mono-不飽和画分およびdi-不飽和画分で閉塞群と対

照群で差異が示された。

Fig. 9は同様に赤血球PCの各脂肪酸分子種への取り込みを示したものであるが、di-不飽和画分において閉塞群と対照群で著しい取り込みの差異が認められた。

以上の結果より、血漿より赤血球へのリン脂質移行時には、閉塞群ではPCが多いが、対照群ではlysoPCがより多く取り込まれていること、またdi-不飽和画分が特に移行していることが示された。

次に赤血球におけるdi-不飽和PCの量的、また放射能の高い取り込みが何に起因するかについて検討した。考えられる理由として、胆管閉塞群で、lysoPCを経由せずに直接PCとして移行する部分が多くなっていること、あるいは、lysoPCとして移行したものが赤血球で再アシル化される速度が胆管閉塞群でより大きいこと、などがあげられる。アシル化能の差異を明らかにするため行った実験(2・2・4)の結果、Table 7に示されるように対照赤血球と胆管閉塞赤血球において、この実験条件下ではアシル化能に有意の差は認められなかった。従って胆管閉塞ラットの赤血球では血漿よりPCのまま直接移行される部分が対照赤血球に比してより多く、また直接移行するPCは胆管閉塞によって増加した血漿PC(di-不飽和PC)であることが強く示唆された。

次にPCが直接移行する機構を解明するために、その原因が胆管閉塞ラットの赤血球側にあるのか、あるいは血漿側にあるのかを検討した(Fig. 10)。まず胆管閉塞血漿から胆管閉塞赤血球へのPC, lysoPCの移行量を対照血漿から対照赤血球へ移行する量と比較した(A)。胆管閉塞血漿からのリン脂質の移行は対照に比してlysoPCで低く、PCでは高くなっており*in vivo*の

Table 6 Fatty acid composition of each molecular species of phosphatidylcholine in plasma from sham operated rat.

Molecular species (% of total phosphatidyl choline in plasma)	Percent of total fatty acids in each fraction				
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>20:4</sub>
Saturated-saturated and saturated-monoenoic (10.8%)	45.8	16.9	35.6	—	—
Saturated-dienoic (44.0%)	28.5	22.1	5.1	44.2	—
Dienoic-dienoic (6.7%)	10.8	10.7	—	78.3	—
Saturated-tetraenoic (40.8%)	26.8	27.0	5.2	—	41.0
% of fatty acid in total phosphatidylcholine	29.1	23.1	8.1	26.8	16.7

Each value is the mean of comparable three or more experiments.

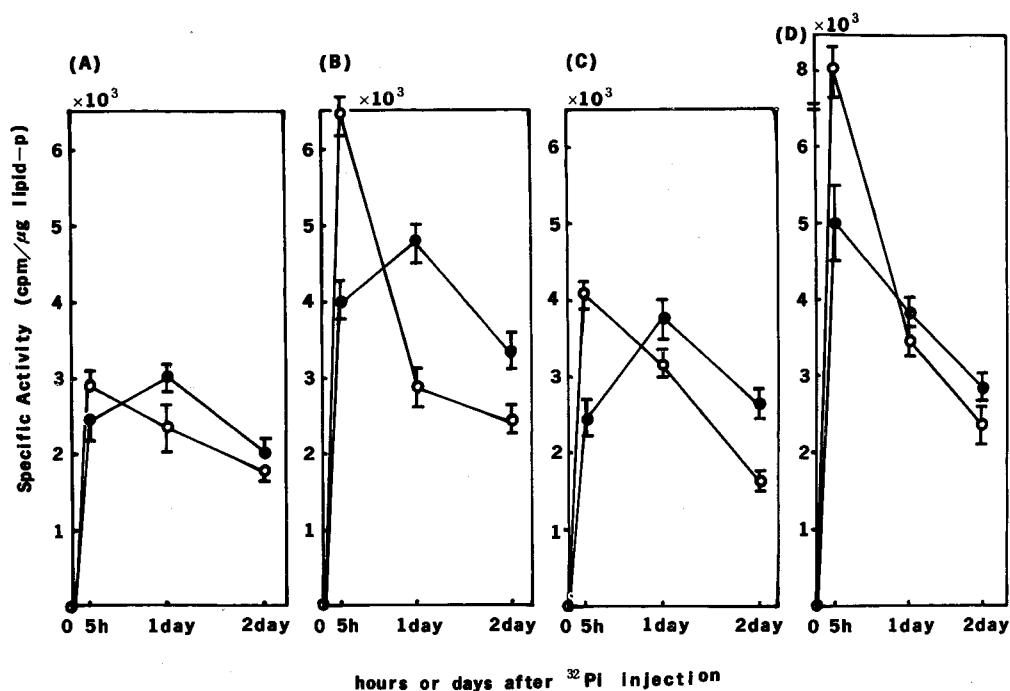


Fig. 7 Changes in the specific activities of each molecular species of phosphatidylcholine in liver after the injection of  $^{32}\text{Pi}$ . Rats were treated with bile duct ligation (●—●) or sham operation (○—○) just before the injection of  $^{32}\text{Pi}$ . Saturated-saturated and saturated-monoenoic (A), saturated-dienoic (B), saturated-tetraenoic and dienoic-dienoic (C) and saturated-hexaenoic (D) fractions are shown. Standard errors are shown by vertical bars.

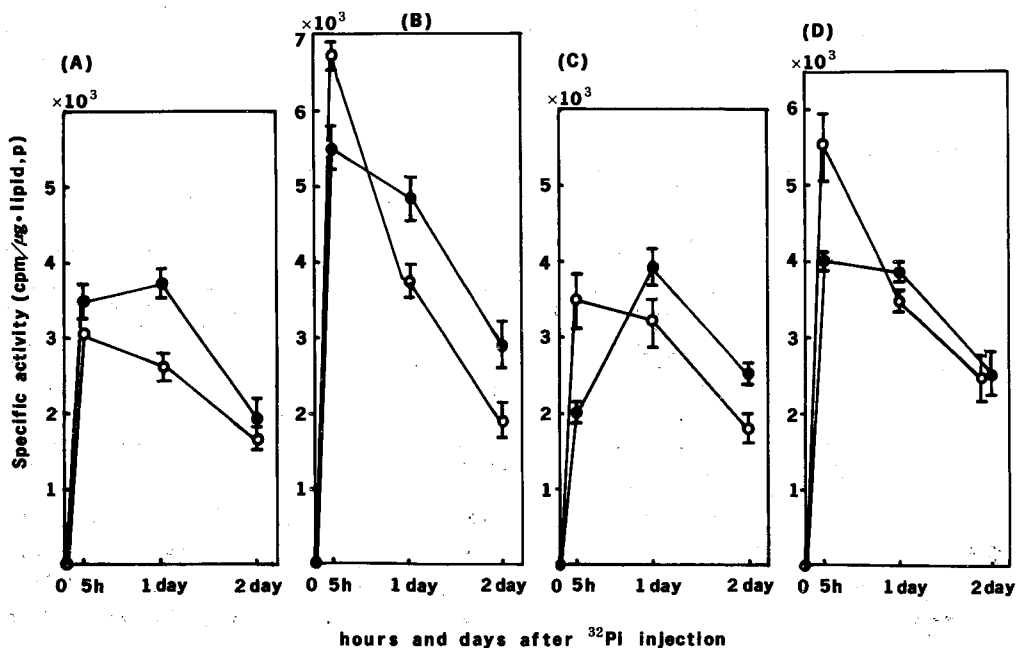


Fig. 8 Changes in the specific activities of each molecular species of phosphatidylcholine in plasma after the injection of  $^{32}\text{Pi}$ . Rats were treated with bile duct ligation (●—●) or sham operation (○—○). Other conditions are the same as described in the legends in Fig. 7.

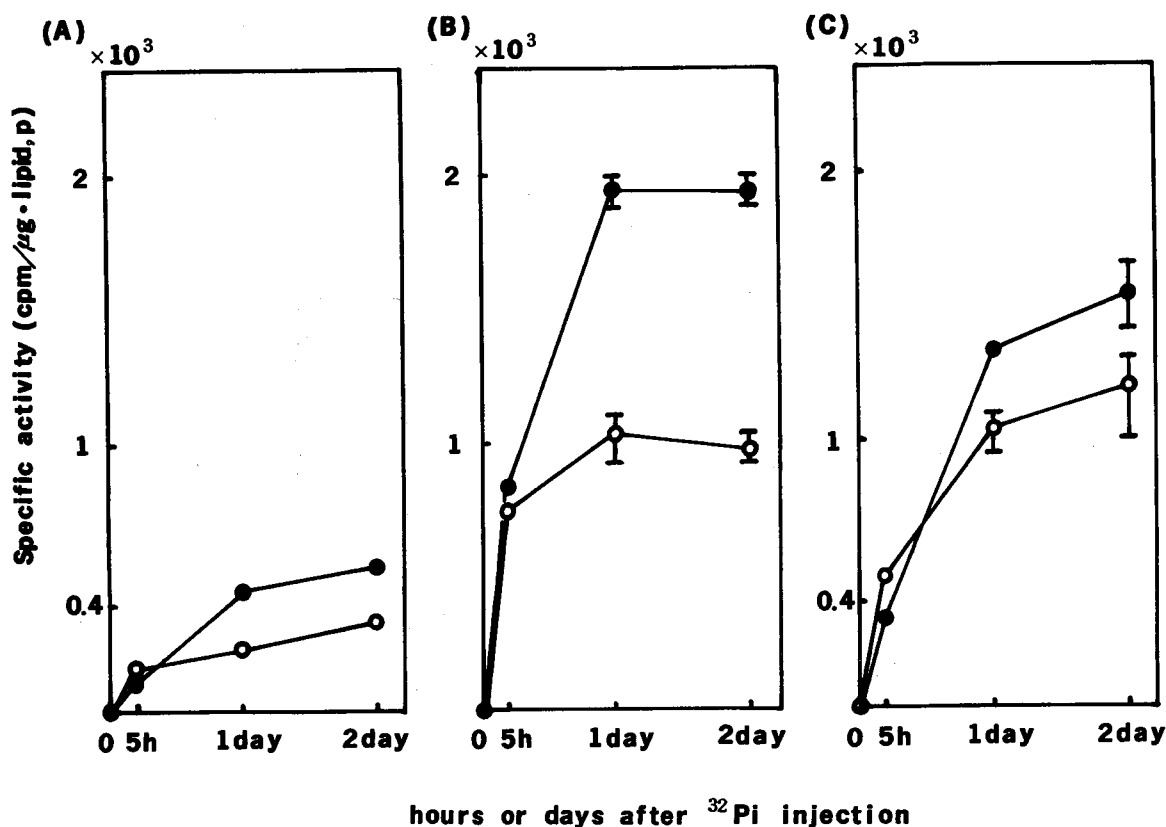


Fig. 9 Changes in the specific activities of each molecular species of phosphatidylcholine in erythrocytes after the injection of  $^{32}\text{Pi}$ . Rats were treated with bile duct ligation (●—●) or sham operation (○—○). Other conditions are the same as described in the legends in Fig. 7 except that tetraenoic are not shown because of the lack of this fraction in erythrocytes.

Table 7 Radioactivity of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in plasma and in erythrocytes after the incubation of erythrocytes with  $^{32}\text{Pi}$ -labelled lysophosphatidylcholine which is suspended in plasma.

Radioactivity in plasma before incubation		Incubation with			
		Control erythrocytes		Ligated erythrocytes	
		Erythrocytes	Plasma	Erythrocytes	Plasma
Lyso PC	9860	2752	6683	2674	6544
PC	0	143	323	199	357

Each value is the mean of comparable three or more experiments.

結果 (Table 5) と一致する。次に acceptor として共に対照赤血球を用い, donor として対照血漿と胆管閉塞血漿を用い両者の比較を行った (B)。(A)と同様に胆管閉塞血漿とのインキュベーションにより対照血漿と比較して PC の増加, lysoPC の減少が認められた。このことは, PC をより多く移行させる要因が血漿中にあることを示唆する。Donor として対照血漿を用い,

acceptor として胆管閉塞赤血球を用いた時の対照群との比較では (C), 3 時間インキュベーション時に (A), (B) と同様の結果を示した。この事実は胆管閉塞赤血球側に PC をより多く, lysoPC を少なく移行させる原因がある事を示している。

血漿側の要因としては, リン脂質, コレステロール, 胆汁酸, ビリルビンなどの濃度の上昇と Lp-X の出現

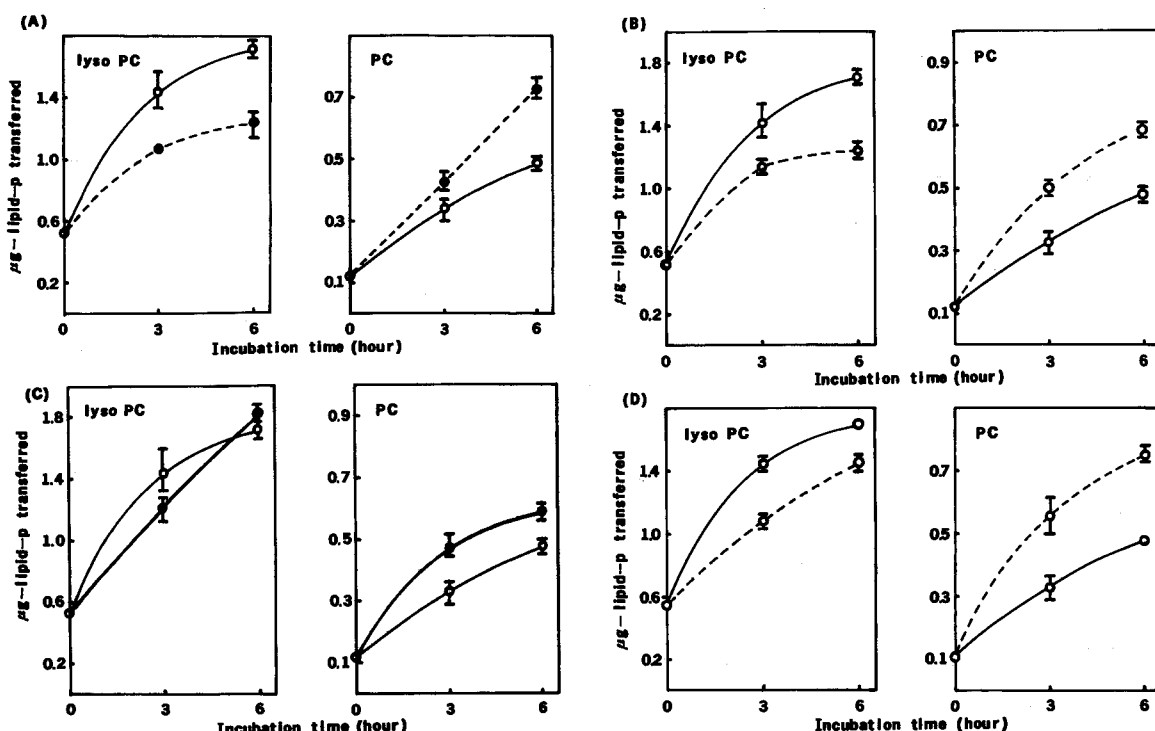


Fig. 10 *In vitro* transfer of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine from plasma to erythrocytes. Each 1 ml of erythrocytes from control (sham operated rat) or ligated (bile duct ligated rat) erythrocytes is incubated with 1 ml of plasma from control or ligated rat ( $^{32}\text{P}$ -labeled *in vivo*) at  $37^\circ\text{C}$  for 0, 3 and 6 hours. Other details are shown in the text. Straight line (—) shows that phospholipids are transferred from control plasma, dashed line (---), from ligated plasma. Open circle (○) shows that phospholipids are transferred to control erythrocytes, closed circle (●), to ligated erythrocytes. In an incubation system (D), sodium glycocholate was added (1 mM).

Standard errors are shown by vertical bars.

があり、赤血球側に影響を与えているものには胆汁酸があり、これは赤血球の spur cell 化、それに伴う赤血球膜のリン脂質存在状態の変化を引き起こす。一般に生体膜間リン脂質の移行反応には、その膜内の脂質の存在状態が大きく影響するといわれている<sup>23)</sup>。胆汁酸の移行反応に及ぼす影響を検討する目的で、対照血漿と対照赤血球とのインキュベーションの系に 1 mM の胆汁酸塩を添加（胆管閉塞後 1 日目の血漿中の濃度<sup>12,13)</sup>）した (D)。 (A)、(B) および 3 時間インキュベーション時の (C) に類似した結果が得られた。このことより既に spur cell 化している赤血球 (A, B)、または胆管閉塞血漿中の胆汁酸塩によりインキュベーション中に spur cell 化した赤血球、または胆汁酸添加により spur cell 化した赤血球はいずれも  $^{32}\text{P}$ -PC をより多く取り込み、 $^{32}\text{P}$ -lysoPC の取り込みは少ないという事実が示された。胆管閉塞赤血球を対照血漿とインキュベートした 6 時間の値 (C) は、胆管閉塞赤血球が対照血漿によ

り正常形態赤血球へ可逆的に変換されたと考えられる。

しかしこれは胆管閉塞血漿中の胆汁酸塩以外の要因 (Lp-X 等) の影響がないとは断言できない。種々の要因のリン脂質移行、交換反応に及ぼす関与の度合についての研究が待たれるところである。

#### 4 考 察

赤血球膜のリン脂質は、赤血球自体でその構成成分より合成するのではなく、血漿リポ蛋白によって供給されていることはよく知られている事実である。この点に関して現在まで二通りの供給の機構が報告されている。第一には血漿リポ蛋白中の PC と赤血球 PC の exchange によるもので非常に遅い速度で行われていることが示されている<sup>2-5)</sup>。第二には赤血球で生成または血漿からの供給による lysoPC のアシル化によるものである<sup>1,24,25)</sup>。これに関しては早くは Sakagami *et al.*<sup>1)</sup> による lysoPC 経由を示した報告があるが<sup>1)</sup>、生体内での

①と②の実際に占める割合などについての報告は見られない。

今回の実験では測定条件の関係で赤血球より血漿への逆反応については示さなかったのが全て血漿から赤血球への移行のみについて述べる。

今回ラット赤血球では正常時には *in vivo*, *in vitro* の系共に lysoPC 経由で供給される部分が多いことが示され、また胆管閉塞ラット赤血球では対照群に比較して PC としての移行が多いことが明らかにされた。

Lyso PC のアシル化は赤血球膜の inner layer で行われることが報告されている<sup>24-26</sup>。Table 7 より胆管閉塞赤血球と対照赤血球でこの実験条件下では取り込まれた lysoPC がアシル化される量は非常に少なく、また両者間に差異のないものと考えられ、胆管閉塞ラットで PC そのまま直接赤血球に取り込まれる部分の多いことが、*in vivo*, *in vitro* の実験から明らかにされた。

アシル化能の差異に関しては outer layer と inner layer 間の PC の flip-flop による速度の差異なども考慮されなくてはならず更なる研究が必要とも思われる。

胆管閉塞群の赤血球、血漿では対照群に比較して dienoic PC の量、放射能共に増大し、胆管閉塞群では PC として直接赤血球へ取り込まれる部分が多く、それは主に di-不飽和 PC であることが強く示唆された。In vitro の実験で胆管閉塞赤血球の PC の取り込みが増加した理由として次の三点が考えられる。

① 胆管閉塞によりリポ蛋白濃度が上昇し、そのために衝突する頻度が高くなり速度が上昇したという可能性。これらについてはデータには示さなかったが、血漿濃度を変化して行った実験でも赤血球に取り込まれる速度は赤血球の量が規定していたことからリポ蛋白濃度の上昇による移行増加とは考え難い。

② 胆管閉塞による赤血球側の変化に原因があるのか、生体細胞膜間またはリポゾーム間のリン脂質の transfer を促進する蛋白質を加えた *in vitro* の実験において膜中に存在するリン脂質の存在状態により交換速度が変化することが示されている<sup>27</sup>。

一方胆汁酸塩のヒト赤血球膜におよぼす影響についての報告<sup>22</sup>によると、胆汁酸塩は膜中の脂質の存在状態を変化させ赤血球を spur cell 化する作用がある。

今回の実験でもインキュベーション液に胆汁酸塩を添加することにより PC の移行の促進作用が認められた。対照血漿から胆管閉塞赤血球と対照赤血球への PC の移行を比較した場合胆管閉塞赤血球へより多く PC が移行した結果と一致する。また、胆管閉塞血漿からは対照血漿と比較してより多くの PC が赤血球へ移行したこ

とは、胆管閉塞血漿中に存在する胆汁酸塩の影響を受けて赤血球形態に変化がおきた結果であろうと考えられる。

これらの事実より、胆管閉塞後初期段階における PC の移行促進は血漿中に増加した胆汁酸塩による赤血球膜脂質存在状態の変化によってもたらされたものであると結論された。

③ Lp-X 融合説があるがこの関与については全く否定する事はできないが、今回の実験結果(Fig. 1)から、閉塞後上昇したリポ蛋白 PC が全て Lp-X 由来のものではないこと、またヒトの胆管閉塞患者には Lp-X が認められない場合があることなど考慮すると、胆管閉塞動物赤血球に増加する PC は Lp-X との fusion(融合)のみによるものとは断定できない。今後の検討が必要である。

## 5 結 語

胆管閉塞患者および胆管閉塞実験動物にみられる異常赤血球(赤血球膜中の PC, コレステロールの増大、それに伴う赤血球の形態変化)の発生機序を解明する目的でラットを用い、放射性無機リン酸 (<sup>32</sup>Pi), <sup>14</sup>C-glycerol などのリン脂質前駆体を胆管閉塞と同時に腹腔内に投与した後、肝、血漿、赤血球の各リン脂質および phosphatidylcholine (PC) 脂肪酸種への取り込みを対照群のそれらと比較した。その結果、

① 閉塞後 1 日目の肝に胆汁由来と考えられる対照群に比較して比放射能の高い di-不飽和 PC の滞留がみられ、これは血漿中に速かに流入してくること、また血漿中に放出されたこの画分は赤血球に活発に取り込まれる。

② 血漿から赤血球への PC の移行様式に対照群と閉塞群で明らかな差異がみられる。すなわち、対照群では主に lysoPC を介して移行するが閉塞群では PC のまま直接移行する割合が多くなっていた。

③ ②の原因について *in vitro* の実験で検討した結果、胆管閉塞血漿中に増加する胆汁酸塩が赤血球膜脂質の存在様式を変化させ、その結果 PC が直接移行しやすくなったと考えられた。

以上のことから、異常赤血球発生機序の一つとして、PC 移行の促進が強く関与していることが示された。

## 文 献

1. Sakagami, T., Minari, O. and Orii, T.: Interaction of individual phospholipids between rat plasma and erythrocytes *in vitro*. Biochim.

- Biophys. Acta **98**, 356-364 (1965).
2. Reed, C. F.: Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog. J. Clin. Invest. **47**, 749-760 (1968).
  3. Smith, N. and Rubinstein, D.: Some characteristics of the exchange of lecithin between rabbit erythrocytes and serum. Can. J. Biochem. **52**, 706-717 (1974).
  4. Renooij, W. and Van Golde, L. M. G.: The transposition of molecular classes of phosphatidylcholine across the rat erythrocyte membrane and their exchange between the red cell membrane and plasma lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta **470**, 465-474 (1977).
  5. Smith, N. B. and Rubinstein, D.: Exchange of phosphatidylcholine between rabbit erythrocytes and plasma *in vivo*. Lipids **16**, 937-939 (1981).
  6. Simon, J. B.: Red cell lipids in liver disease: Relationship to serum lipids and to lecithin-cholesterol acyltransferase. J. Lab. Clin. Med. **77**, 891-900 (1971).
  7. Lehmann, B. V., Grajewski, O. and Oberdisse, E.: Correlation between serum lecithin-cholesterol-acyltransferase activity and erythrocyte lipid content during experimental liver damage. Arch. Pharmacol. **298**, 211-216 (1977).
  8. Cooper, R. A. and Jandle, J. H.: Bile salt and cholesterol in the pathogenesis of target cell in obstructive jaundice. J. Clin. Invest. **47**, 809-822 (1968).
  9. Verkleij, A. J. and Nauta, I. L. D., Weere, J. M., Mandersloot, J. G., Reinders, B., Ververgreat, P. H. J. Th. and De Dier, J.: The fusion of abnormal plasma lipoprotein (Lp-X) and the erythrocyte membrane in patients with cholestasis studied by electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta **436**, 366-376 (1976).
  10. Okano, Y., Iida, H., Yamauchi, T., Sekiya, T., Kuwabara, H., Goto, M. and Nozawa, Y.: Abnormalities of erythrocyte membranes in biliary atresia; Ultrastructure and lipid composition. Clin. Chim. Acta **94**, 317-325 (1979).
  11. Okano, Y., Yamauchi, T., Sekiya, T., Iida, H., Hasegawa, I. and Nozawa, Y.: Mechanism for lipid abnormalities of erythrocyte membranes in biliary obstruction; Lecithin content and its fatty acid composition. Clin. Chim. Acta **88**, 237-248 (1978).
  12. 田辺文彦, 谷口正子: ラット胆管閉塞の赤血球形態および膜脂質組成におよぼす影響. 札幌医誌 **51**, 391-403 (1982).
  13. Taniguchi, M., Tanabe, F., Ishikawa, H. and Sakagami, T.: Experimental biliary obstruction of rat. Initial changes in the structure and lipid content of erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta **753**, 22-31 (1983).
  14. Rose, H. G. and Oklander, M.: Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. J. Lipid Res. **6**, 428-431 (1965).
  15. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. **226**, 497-509 (1957).
  16. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. **234**, 466-468 (1959).
  17. Arvidson, G. A. E.: Structure and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. Eur. J. Biochem. **4**, 478-486 (1968).
  18. Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R.: Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. **38**, 514-515 (1966).
  19. Ritland, S.: Demonstration of the abnormal lipoprotein of cholestasis, Lp-X, by precipitation with polyanion. Scand. J. Gastroenterol. **7**, 507-510 (1974).
  20. Calandra, S., Montaguti, M., Cartoni, V. and Paquali Ronchetti, I.: Plasma lipoprotein in rats with experimental biliary obstruction. I. A chemical study. Biochim. Biophys. Acta **409**, 1-12 (1975).
  21. Kawamoto, T., Okano, G. and Akino, T.: Biosynthesis and turnover of individual molecular species of phosphatidylcholine in liver and bile. Biochim. Biophys. Acta **619**, 20-34 (1980).
  22. Blington, D. and Coleman, R.: Effects of bile salts on human erythrocytes. Plasma membrane vesiculation, phospholipid solubilization and their possible relationships to bile secretion. Biochim. Biophys. Acta **509**, 33-47 (1978).
  23. Wirtz, K. W. A., Vriend, G. and Westerman, J.: Kinetic analysis of the interaction of the phosphatidylcholine exchange protein with unilamellar vesicles and multilamellar liposomes. Eur. J. Biochem. **94**, 215-221 (1979).
  24. Oliveira, M. M., Vaughan, M.: Incorporation of fatty acids into phospholipids of erythrocyte membranes. J. Lipid Res. **5**, 156-162 (1964).
  25. Mulder, E. and Van Deenen, L. L. M.: Metabolism of red-cell lipids. I. Incorporation *in vitro* of fatty acids into phospholipids from mature erythro-

- cytes. *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 106-117 (1965).
26. Shohet, S. H., Nathan, D. G. and Karnovsky, M. L.: Stages in the incorporation of fatty acids into red blood cell. *J. Clin. Invest.* **47**, 1096-1108 (1968).
27. Renooij, W., Van Golde, L. M. G., Zwaal, R. F.

A. and Van Deenen, L. L. M.: Topological asymmetry of phospholipid metabolism in rat erythrocyte membranes. Evidence for Flip Flop of lecithin. *Eur. J. Biochem.* **61**, 53-58 (1976).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学外科学第1講座 石川秀人